



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: **0 417 563 A2**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 90116707.2

(5) Int. Cl.<sup>5</sup> C07K 15/12, C12N 15/12,  
C12N 1/21, C07K 3/28,  
A61K 39/395

(22) Anmelddatag: 31.08.90

(30) Priorität: 12.09.89 CH 3319/89  
08.03.90 CH 746/90  
20.04.90 CH 1347/90

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
20.03.91 Patentblatt 91/12

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE DK FR GB IT LI NL

(71) Anmelder: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG  
Postfach 3255  
CH-4002 Basel(CH)

(72) Erfinder: Brockhaus, Manfred, Dr.  
Talweg 29

CH-4126 Bettingen(CH)

Erfinder: Dembic, Zlatko, Dr.

Gempenstrasse 39

CH-4053 Basel(CH)

Erfinder: Gentz, Reiner, Dr.

Finkenweg 13

W-7888 Rheinfelden(DE)

Erfinder: Lesslauer, Werner, Dr.

Marignanostrasse 16

D-4059 Basel(CH)

Erfinder: Lötscher, Hansruedi, Dr.

Frankenstrasse 18

CH-4313 Möhlin(CH)

Erfinder: Schlaeger, Ernst-Jürgen, Dr.

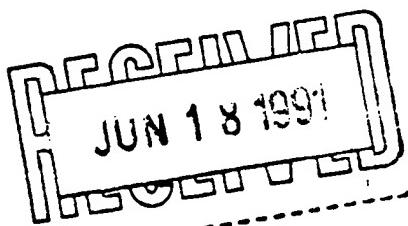
Neue Strasse 63

W-7859 Efringen-Kirchen(DE)

(74) Vertreter: Mezger, Wolfgang, Dr. et al  
Grenzacherstrasse 124 Postfach 3255  
CH-4002 Basel(CH)

(54) TNF-bindende Proteine.

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft nichtlösliche Proteine sowie lösliche oder nichtlösliche Fragmente davon, die TNF binden, in homogener Form, sowie deren physiologisch verträglichen Salze, insbesondere solche Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 55 oder 75 kD (nichtreduzierende SDS-PAGE-Bedingungen), Verfahren zur Isolierung solcher Proteinen Antikörper gegen solche Proteine, DNA-Sequenzen, die für nichtlösliche Proteine sowie lösliche oder nichtlösliche Fragmente davon, die TNF binden, kodieren, wie solche, die für Proteine kodieren, die zum einen Teil aus einem löslichen Fragment das TNF bindet und zum anderen Teil aus allen Domänen ausser der ersten der konstanten Region der schweren Kette humander Immunglobuline bestehen und die davon kodierten rekombinanten Proteine wie Verfahren zur deren Herstellung mittels transformierter pro- wie eukaryotischer Wirtszellen.



**EP 0 417 563 A2**

- (IIB) Val-Phe-Cys-Thr
- (IIC) Asn-Gln-Pro-Gln-Ala-Pro-Gly-Val-Glu-Ala-Ser-Gly-Ala-Gly-Glu-Ala
- (IID) Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-X-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys
- (IIE) Ile-X-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Tyr-Pro-Ala-Leu-Glu
- 5 (IIF) Leu-Cys-Ala-Pro
- (IIG) Val-Pro-His-Leu-Pro-Ala-Asp
- (IH) Gly-Ser-Gln-Gly-Pro-Glu-Gln-X-X-Leu-Ile-X-Ala-Pro wobei X für einen Aminosäurerest steht, der nicht eindeutig bestimmt werden konnte.

Im Stand der Technik sind bereits TNF-BP durch eine N-terminale Teilsequenz charakterisiert worden [Europäische Patentanmeldung mit der Publikations-Nr. 308 378], wobei sich diese Sequenz von der erfindungsgemäßen N-terminalen Teilsequenz gemäß Formel (IA) unterscheidet. Im übrigen handelt es sich aber bei den im Stand der Technik beschriebenen TNF-Bindeproteinen um aus dem Urin isolierten löslichen d.h. nicht membrangebundene, TNF-BP und nicht um membrangebundene, d.h. unlösliche, TNF-BP.

Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind auch Verfahren zur Isolierung der erfindungsgemäßen TNF-BP. Diese Verfahren sind dadurch charakterisiert, dass man im wesentlichen die folgenden Reinigungsschritte nacheinander ausführt: Herstellung eines Zell- oder Gewebeextraktes, Immunaffinitätschromatographie und/oder ein- oder mehrfache Ligandenaffinitätschromatographie, hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und präparative SDS-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE). Die Kombination der aus dem Stand der Technik bekannten einzelnen Reinigungsschritte ist für den Erfolg des erfindungsgemäßen Verfahrens essentiell, wobei einzelne Schritte im Rahmen der zu lösenden Aufgabe modifiziert und verbessert wurden. So wurde beispielsweise der ursprünglich für die Anreicherung von TNF-BP aus humaner Placenta [31] verwendete kombinierte Immunaffinitätschromatographie/TNF $\alpha$ -Ligandenaffinitätschromatographie-Schritt dadurch abgeändert, dass eine BSA-Sepharose 4B-Vorsäule verwendet wurde. Diese Vorsäule wurde zum Auftrag des Zell- oder Membranextraktes in Reihe mit der Immunaffinitätsäule und gefolgt von der Ligandenaffinitätsäule geschaltet. Nach Auftrag des Extraktes wurden die beiden zuletztgenannten Säulen abgekoppelt, jede für sich eluiert und die TNF-BP-aktiven Fraktionen wurden nochmals über eine Ligandenaffinitätsäule gereinigt. Erfindungswesentlich für die Durchführung des Umkehrphasen-HPLC-Schrittes ist die Verwendung eines Detergens-haltigen Lösungsmittelgemisches.

Ferner ist auch ein technisches Verfahren zum Erzielen hoher Zelldichten von Säugerzellen, aus denen TNF-BP isoliert werden können, Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ein solches Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass ein Medium, welches für die spezifischen Wachstumserfordernisse der verwendeten Zelllinie entwickelt wurde, in Verbindung mit einer wie z.B. im Detail in Beispiel 2 beschriebenen Perfusionsapparatur verwendet wird. Mittels eines solchen Verfahrens lassen sich beispielsweise für HL-60-Zellen bis zu mehr als 20-fach höhere Zelldichten als üblich erzielen.

Zusätzlich dazu betrifft die vorliegende Erfindung auch DNA-Sequenzen, die für Proteine und lösliche oder nichtlösliche Fragmente davon, die TNF binden, kodieren. Darunter sind beispielsweise DNA-Sequenzen zu verstehen, die für nichtlösliche Proteine oder lösliche wie nicht lösliche Fragmente davon, die TNF binden, kodieren, wobei solche DNA-Sequenzen aus den folgenden auswählbar sind:

- 40 (a) DNA-Sequenzen, wie sie in Figur 1 oder Figur 4 dargestellt sind, wie deren komplementäre Stränge, oder solche, die diese Sequenzen umfassen;
- (b) DNA-Sequenzen, die mit wie unter (a) definierten Sequenzen oder Fragmenten davon hybridisieren;
- (c) DNA-Sequenzen, die auf Grund der Entartung des genetischen Codes nicht mit Sequenzen, wie unter (a) und (b) definierte, hybridisieren, aber die für Polypeptide mit genau gleicher Aminosäuresequenz kodieren.

Das heisst, dass von der vorliegenden Erfindung nicht nur allelische Varianten, sondern auch solche DNA-Sequenzen umfasst sind, die sich durch Deletionen, Substitutionen und Additionen von einem oder mehreren Nukleotiden der in Figur 1 bzw. 4 dargestellten Sequenzen ergeben, wobei es sich bei den davon kodierten Proteinen nach wie vor um TNF-BP handelt. Eine Sequenz, die sich durch eine solche Deletion ergibt, ist beispielsweise in Science 248, 1019-1023, (1990) beschrieben.

Bevorzugt sind einmal solche DNA-Sequenzen, welche für ein solches Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 55 kD kodieren, wobei die in Abbildung 1 dargestellte Sequenz besonders bevorzugt ist, wie Sequenzen, die für nichtlösliche wie lösliche Fragmente von solchen Proteinen kodieren. Eine DNA-Sequenz, die beispielsweise für ein solches nichtlösliches Protein-Fragment kodiert, reicht von 55 Nukleotid -185 bis 1122 der in Abbildung 1 gezeigten Sequenz. DNA-Sequenzen, die für lösliche Protein-Fragmente kodieren, sind beispielsweise solche, die von Nukleotid -185 bis 633 bzw. von Nukleotid -14 bis 633 der in Abbildung 1 gezeigten Sequenz reichen. Bevorzugt sind ebenfalls DNA-Sequenzen, die für ein Protein von etwa 75/65 kD kodieren, wobei solche, die die in Figur 4 dargestellte Partielle cDNA-Sequenzen

angegebenen Elektro-Dialysezeiten generell zu verdoppeln sind. Danach noch verbleibende Spuren von SDS können dann gemäss Bosserhoff et al. [50] entfernt werden.

- Die so gereinigten TNF-BP können mittels der im Stand der Technik bekannten Methoden der Peptidchemie, wie beispielsweise N-terminale Aminosäuresequenzierung oder enzymatische wie chemische 5 Peptidspaltung charakterisiert werden. Durch enzymatische oder chemische Spaltung erhaltene Fragmente können nach gängigen Methoden, wie beispielsweise HPLC, aufgetrennt und selbst wieder N-terminal sequenziert werden. Solche Fragmente, die selbst noch TNF binden, können mittels der obengenannten Nachweismethoden für TNF-BP identifiziert werden und sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.
- 10 Ausgehend von der so erhältlichen Aminosäuresequenzinformation oder den in Figur 1 wie Figur 4 dargestellten DNA- wie Aminosäuresequenzen können unter Beachtung der Degeneration des genetischen Codes nach im Stand der Technik bekannten Methoden geeignete Oligonukleotide hergestellt werden [51]. Mittels dieser können dann wiederum nach bekannten Methoden der Molekularbiologie [42,43] cDNA- oder 15 genomische DNA-Banken nach Klonen, die für TNF-BP kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, abgesucht werden. Außerdem können mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [49] cDNA-Fragmente kloniert werden, indem von zwei auseinanderliegenden, relativ kurzen Abschnitten der Aminosäuresequenz unter Beachtung des genetischen Codes vollständig degenerierte und in ihrer Komplementarität geeignete Oligonucleotide als "Primer" eingesetzt werden, wodurch das zwischen diesen beiden Sequenzen liegende Fragment amplifiziert und identifiziert werden kann. Die Bestimmung der Nukleotidsequenz eines derartigen 20 Fragmentes ermöglicht eine unabhängige Bestimmung der Aminosäure-Sequenz des Proteinfragments, für das es kodiert. Die mittels der PCR erhältlichen cDNA-Fragmente können ebenfalls, wie bereits für die Oligonukleotide selbst beschrieben, nach bekannten Methoden zum Aufsuchen von für TNF-BP kodierende Nukleinsäuresequenzen enthaltenden Klonen aus cDNA- bzw. genomische DNA-Banken verwendet werden. Solche Nukleinsäuresequenzen können dann nach bekannten Methoden sequenziert werden [42]. Aufgrund 25 der so bestimmten wie der für bestimmte Rezeptoren bereits bekannten Sequenzen können solche Teilsequenzen, die für lösliche TNF-BP-Fragmente kodieren, bestimmt und mittels bekannter Methoden aus der Gesamtsequenz herausgeschnitten werden [42].

Die gesamte Sequenz oder solche Teilsequenzen können dann mittels bekannter Methoden in im Stand der Technik beschriebene Vektoren zu deren Vervielfältigung wie Expression in Prokaryoten integriert 30 werden [42]. Geeignete Prokaryotische Wirtsorganismen stellen beispielsweise gram-negative wie gram-Positive Bakterien, wie beispielsweise *E. coli* Stämme, wie *E. coli* HB 101 [ATCC Nr. 33 694] oder *E. coli* W3110 [ATCC Nr. 27 325] oder *B. subtilis* Stämme dar.

Weiterhin können erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen, die für TNF-BP sowie für TNF-BP-Fragmente kodieren, in geeignete Vektoren zur Vermehrung wie Expression in eukaryotischen Wirtszellen, 35 wie beispielsweise Hefe, Insekten- u.h. Säugerzellen, mittels bekannter Methoden integriert werden. Expression solcher Sequenzen erfolgt bevorzugt in Säuger- wie Insektenzellen.

Ein typischer Expressionsvektor für Saugerzellen enthält ein effizientes Promotorelement, um eine gute Transkriptionsrate zu erzielen, die zu exprimierende DNA-Sequenz und Signale für eine effiziente Termination und Polyadenylierung des Transkripts. Weitere Elemente, die verwendet werden können, sind 40 "Enhancer", welche zu nochmals verstärkter Transkription führen und Sequenzen, welche z.B. eine längere Halbwertszeit der mRNA bewirken können. Zur Expression von Nukleinsäuresequenzen, denen das endogene für ein Signalpeptid kodierende Sequenzstück fehlt, können Vektoren verwendet werden, die solche geeignete Sequenzen, die für Signalpeptide von anderen bekannten Proteinen kodieren, enthalten. Siehe beispielsweise der von Cullen, B.R. in Cell 46, 973-982 (1986) beschriebene Vektor pLJ268 oder auch bei 45 Sharma, S. et al. in "Current Communications in Molecular Biology", edt. by Gething, M.J., Cold Spring Harbor Lab. (1985), Seiten 73-78.

Die meisten Vektoren, die für eine transiente Expression einer bestimmten DNA-Sequenz in Säugerzellen verwendet werden, enthalten den Replikationsursprung des SV40 Virus. In Zellen, die das T-Antigen des Virus exprimieren, (z.B. COS-Zellen), werden diese Vektoren stark vermehrt. Eine vorübergehende Expression ist aber nicht auf COS-Zellen beschränkt. Im Prinzip kann jede transfektierbare Säugerzelllinie hierfür verwendet werden. Signale, die eine starke Transkription bewirken können, sind z.B. die frühen und späten Promotoren von SV40, der Promoter and Enhancer des "major immediate-early" Gens des HCMV (humaner Cytomegalovirus), die LTRs ("long terminal repeats") von Retroviren, wie beispielsweise RSV, HIV und MMTV. Es können aber auch Signale von zellulären Genen, wie z.B. die Promotoren des Aktin- und Collagenase-Gens, verwendet werden.

Alternativ können aber auch stabile Zelllinien, die die spezifische DNA-Sequenz im Genom (Chromosom) integriert haben, erhalten werden. Hierzu wird die DNA-Sequenz zusammen mit einem selektierbaren Marker, z.B. Neomycin, Hygromycin, Dihydrofolat-Reduktase (dhfr) oder Hypoxanthin-

beschriebenen Verfahren verwendet werden. Solche Antikörper, insbesondere monoklonale Antikörper gegen die 75 kD-TNF-BP-Spezies, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Solche gegen die 75 kD TNF-BP gerichtete Antikörper können durch den Fachmann geläufige Modifikationen des in den Beispielen 4-6 im Detail beschriebenen Reinigungsverfahrens zur Isolierung von TNF-BP eingesetzt werden.

5 Auf Grund der hohen Bindungsaffinität erfindungsgemässer TNF-BP für TNF ( $K_d$ -Werte in den Größenordnungen von  $10^{-9}$  -  $10^{-10}$  M) können diese oder Fragmente davon als Diagnostika zum Nachweis von TNF in Serum oder anderen Körperflüssigkeiten nach im Stand der Technik bekannten Methoden, beispielsweise in Festphasenbindungstests oder in Verbindung mit Anti-TNF-BP-Antikörpern in sogenannten "Sandwich"-Tests, eingesetzt werden.

10 Im übrigen können erfindungsgemäße TNF-BP einerseits zur Reinigung von TNF und andererseits zum Auffinden von TNF-Agonisten sowie TNF-Antagonisten nach im Stand der Technik bekannten Verfahren verwendet werden.

15 Die erfindungsgemässen TNF-BP sowie deren physiologisch verträgliche Salze, die nach im Stand der Technik bekannten Methoden hergestellt werden können, können auch zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten, vor allem solchen zur Behandlung von Krankheiten, bei deren Verlauf TNF involviert ist, verwendet werden. Dazu kann eine oder mehrere der genannten Verbindungen, falls wünschenswert bzw. erforderlich in Verbindung mit anderen pharmazeutisch aktiven Substanzen, mit den üblicherweise verwendeten festen oder flüssigen Trägermaterialien in bekannter Weise verarbeitet werden. Die Dosierung solcher Präparate kann unter Berücksichtigung der üblichen Kriterien in Analogie zu bereits verwendeten Präparaten ähnlicher Aktivität und Struktur erfolgen.

20 Nachdem die Erfindung vorstehend allgemein beschrieben worden ist, sollen die folgenden Beispiele Einzelheiten der Erfindung veranschaulichen, ohne dass diese dadurch in irgendeiner Weise eingeschränkt wird.

25

#### Beispiel 1

##### 30 Nachweis von TNF-bindenden Proteinen

Die TNF-BP wurden in einem Filtertest mit humanem radio-jodiertem  $^{125}\text{I}$ -TNF nachgewiesen. TNF (46.47) wurde mit  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (IMS40, Amersham, Amersham, England) und Iodo-Gen (#28600, Pierce Eurochemie, Oud-Beijerland, Niederlande) nach Fraker und Speck [48] radioaktiv markiert. Zum Nachweis der TNF-BP wurden isolierte Membranen der Zellen oder ihre solubilisierten, angereicherten und gereinigten Fraktionen auf angefeuchtete Nitrocellulose-Filter (0.45  $\mu$ , BioRad, Richmond, California, USA) aufgetragen. Die Filter wurden dann in Pufferlösung mit 1% entfettetem Milchpulver blockiert und anschliessend mit  $5 \cdot 10^5$  cpm/ml  $^{125}\text{I}$ -TNF $\alpha$  (0.3-1.0  $\cdot 10^8$  cpm/ $\mu\text{g}$ ) in zwei Ansätzen mit und ohne Beigabe von 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  nicht-markiertem TNF $\alpha$  inkubiert, gewaschen und luftgetrocknet. Die gebundene Radioaktivität wurde autoradiographisch semiquantitativ nachgewiesen oder in einem  $\gamma$ -Counter gezählt. Die spezifische  $^{125}\text{I}$ -TNF- $\alpha$ -Bindung wurde nach Korrektur für unspezifische Bindung in Anwesenheit von unmarkiertem TNF- $\alpha$  im Ueberschuss ermittelt. Die spezifische TNF-Bindung im Filtertest wurde bei verschiedenen TNF-Konzentrationen gemessen und nach Scatchard analysiert [33], wobei ein  $K_d$ -Wert von  $10^{-9}$ - $10^{-10}$  M ermittelt wurde.

45

#### Beispiel 2

##### 50 Zellextrakte von HL-60-Zellen

HL60 Zellen [ATCC-Nr. CCL 240] wurden in experimentellem Labormasstab in einem RPMI 1640-Medium [GIBCO-Katalog Nr. 074-01800], das noch 2 g/l  $\text{NaHCO}_3$  und 5% fötales Kälberserum enthielt, in einer 5%  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre kultiviert und anschliessend zentrifugiert.

55 Zum Erzielen hoher Zelldichten in technischem Maßstab wurde folgendermassen verfahren. Die Züchtung wurde in einem 75 l Airliftfermenter (Fa. Chemap, Schweiz) mit 58 l Arbeitsvolumen durchgeführt. Hierfür wurde das Kassettenmembransystem "PROSTAK" (Millipore, Schweiz) mit einer Membranfläche von 0,32 m<sup>2</sup> (1 Kassette) in den äusseren Zirkulationskreislauf integriert. Das Kulturmedium (siehe Tabelle

	MgSO <sub>4</sub> (wasserfrei)	68,37
	NaCl	5801,8
5	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (wasserfrei)	188,408
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	75
	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> · 5H <sub>2</sub> O	9,6 · 10 <sup>-3</sup>
10	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,1726
	D-Glucose	4000
15	Glutathion (red.)	0,2
	Hepes-Puffer	2383,2
	Hypoxanthin	0,954
	Linolsäure	0,0168
20	Liponsäure	0,042
	Phenolrot	10,24
	Putrescin 2HCl	0,0322
25	Na-Pyruvat	88
	Thymidin	0,146
	Biotin	0,04666
	D-Ca-Pantothenat	2,546
30	Cholinchlorid	5,792
	Folsäure	2,86
	i-Inositol	11,32
35	Niacinamid	2,6
	Nicotinamid	0,0074
	para-Aminobenzoësäure	0,2
	Pyridoxal HCl	2,4124
40	Pyridoxin HCl	0,2
	Riboflavin	0,2876
	Thiamin HCl	2,668
45	Vitamin B <sub>12</sub>	0,2782
	L-Alanin	11,78
50	L-Asparaginsäure	10
	L-Asparagin H <sub>2</sub> O	14,362
	L-Arginin	40
	L-Arginin HCl	92,6
55	L-Aspartat	33,32

Herstellung von monoklonalen (TNF-BP)-Antikörpern

Ein gemäss Beispiel 2 erhaltener Zentrifugationsüberstand aus Kultivierung von HL60-Zellen im experimentellen Labormasstab wurde im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt. Der verdünnte Überstand wurde bei 4 °C auf eine Säule aufgetragen (Flussrate: 0.2 ml/min.), die 2 ml Affigel 10 enthielt (Bio Rad Katalog Nr. 153-6099), an das 20 mg rekombinantes humanes TNF- $\alpha$  [Pennica, D. et al. (1984) Nature 312, 724; Shirai, T. et al. (1985) Nature 313, 803; Wang, A.M. et al. (1985) Science 228, 149] gemäss den Empfehlungen des Herstellers gekoppelt worden war. Die Säule wurde bei 4 °C und einer Durchflussrate von 1 ml/min zuerst mit 20 ml PBS, das 0,1% Triton X 114 enthielt und danach mit 20 ml PBS gewaschen.

So angereichertes TNF-BP wurde bei 22 °C und einer Flussrate von 2 ml/min mit 4 ml 100 mM Glycin, pH 2.8, 0,1% Decylmaltosid eluiert. Das Eluat wurde in einer Centricon 30 Einheit [Amicon] auf 10  $\mu$ l konzentriert.

10  $\mu$ l dieses Eluates wurden mit 20  $\mu$ l vollständigem Freundschen Adjuvans zu einer Emulsion gemischt. Je 10  $\mu$ l der Emulsion wurden gemäss dem von Holmdahl, R. et al. [(1985), J. Immunol. Methods 83 379] beschriebenen Verfahren an den Tagen 0, 7 und 12 in eine hintere Fusspfote einer narkotisierten Balb/c-Maus injiziert.

Am Tag 14 wurde die immunisierte Maus getötet, der popliteale Lymphknoten herausgenommen, zerkleinert und in Iscove's Medium (IMEM, GIBCO Katalog Nr. 074-2200), das 2 g/l NaHCO<sub>3</sub> enthielt, durch wiederholtes Pipettieren suspendiert. Gemäss einem modifizierten Verfahren von De St.Groth und Scheidegger [J. Immunol. Methods (1980), 35, 1] wurden  $5 \times 10^7$  Zellen des Lymphknotens mit  $5 \times 10^7$  PAI Maus-Myelomazellen (J.W. Stocker et al., Research Disclosure, 217, Mai 1982, 155-157), die sich in logarithmischem Wachstum befanden, fusioniert. Die Zellen wurden gemischt, durch Zentrifugation gesammelt und durch leichtes Schütteln in 2 ml 50% (v/v) Polyethylenglycol in IMEM bei Raumtemperatur resuspendiert und durch langsame Zugabe von 10 ml IMEM während 10 Minuten vorsichtigen Schüttelns verdünnt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt und in 200 ml vollständigem Medium [IMEM + 20% fötales Kälberserum, Glutamin (2,0 mM), 2-Mercaptoethanol (100  $\mu$ M), 100  $\mu$ M Hypoxanthine, 0,4  $\mu$ M Aminopterin und 16  $\mu$ M Thymidine (HAT)] resuspendiert. Die Suspension wurde auf 10 Gewebekulturschalen, die jeweils 96 Vertiefungen enthielten, verteilt und ohne Wechsel des Mediums bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 98% 11 Tage lang inkubiert.

Die Antikörper zeichnen sich aus durch ihre inhibierende Wirkung auf die TNF-Bindung an HL60-Zellen oder durch ihre Bindung an Antigen im Filtertest gemäss Beispiel 1. Zum Nachweis der biologischen Aktivität von anti(TNF-BP)-Antikörpern wurde folgendermassen verfahren:  $5 \times 10^6$  HL60 oder U937-Zellen wurden in vollständigem RPMI 1640 Medium zusammen mit affinitätsgereinigten monoklonalen anti-(TNF-BP)-Antikörpern oder Kontrollantikörpern (d.h. solchen, die nicht gegen TNF-BP gerichtet sind) in einem Konzentrationsbereich von 1 ng/ml bis 10  $\mu$ g/ml inkubiert. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt und mit 4,5 ml PBS bei 0 °C gewaschen. Sie wurden in 1 ml vollständigem RPMI 1640 Medium (Beispiel 2), das zusätzlich 0,1% Natriumazid und <sup>125</sup>I-TNF $\alpha$  ( $10^6$  cpm/ml) mit oder ohne Beigabe von unmarkiertem TNF $\alpha$  (s.o.) enthielt, resuspendiert. Die spezifische Radioaktivität des <sup>125</sup>I-TNF $\alpha$  betrug 700 Ci/mmol. Die Zellen wurden 2 Stunden bei 4 °C inkubiert, gesammelt und 4 mal mit 4,5 ml PBS, das 1% BSA und 0,001% Triton X 100 (Fluka) enthielt, bei 0 °C gewaschen. Die an die Zellen gebundene Radioaktivität wurde in einem  $\gamma$ -Scintillations-zähler gemessen. In einem vergleichbaren Experiment wurde die zellgebundene Radioaktivität von Zellen, die nicht mit anti-(TNF-BP)-Antikörpern behandelt worden waren, bestimmt (ungefähr 10 000 cpm/ $5 \times 10^6$  Zellen).

45

Beispiel 450 Affinitätschromatographie

Für die weitere Reinigung wurden jeweils ein gemäss Beispiel 3 erhaltener monoklonaler anti-(55 kD TNF-BP)-Antikörper (2,8 mg/ml Gel), TNF $\alpha$  (3,0 mg/ml Gel) und Rinderserumalbumin (BSA, 8,5 mg/ml Gel) gemäss den Vorschriften des Herstellers kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gekoppelt. Der gemäss Beispiel 2 erhaltene Zellextrakt wurde über die so hergestellten und in der folgenden Reihenfolge hintereinandergeschalteten Säulen geleitet: BSA-Sepharose-Vorsäule, Immunaffinitätsäule [Anti-(55 kD-TNF-BP)-Antikörper], TNF $\alpha$ -Ligand-Affinitätsäule. Nach vollständigem Auftrag wurden die beiden letzten genannten Säulen abgetrennt und einzeln für sich mit je 100 ml der folgenden

markierter, affinity gereinigter (Mausimmunglobulin-Sepharose-4B-Affinitätsäule) Kaninchen-anti-Maus-  
Immunoglobulin-Antikörper zum autoradiographischen Nachweis dieses Antikörpers eingesetzt.

Proben, die gemäss Beispiel 4 durch zweimalige TNF- $\alpha$ -Ligandenaffinitätschromatographie des Durch-  
laufs der Immunaffinitätschromatographie erhalten und durch HPLC gemäss Beispiel 5 weiter aufgetrennt  
5 worden waren, zeigten unter den oben spezifizierten SDS-PAGE- und Blottransfer-Bedingungen zwei  
zusätzliche Banden von 75 kD und 65 kD, die beide im Filtertest (Beispiel 1) spezifisch TNF banden. Im  
Western Blot gemäss Towbin et al. (s.o.) reagierten die Proteine dieser beiden Banden nicht mit dem  
gemäss Beispiel 3 hergestellten anti-(55 kD TNF-BP)-Antikörper. Sie reagierten allerdings mit einem  
monoklonalen Antikörper, der ausgehend von der 75 kD-Bande (anti-75 kD TNF-BP-Antikörper) gemäss  
10 Beispiel 3 erzeugt worden war.

### Beispiel 7

15

#### Aminosäuresequenzanalyse

Zur Aminosäuresequenzanalyse wurden die gemäss Beispiel 5 erhaltenen und gemäss Filtertest  
20 (Beispiel 1) aktiven Fraktionen mittels der in Beispiel 6 beschriebenen, nun jedoch reduzierenden, SDS-  
PAGE Bedingungen (SDS-Probenpuffer mit 125 mM Dithiothreitol) aufgetrennt. Es wurden die gleichen  
Banden wie gemäss Beispiel 6 gefunden, die allerdings auf Grund der reduzierenden Bedingungen der  
SDS-PAGE im Vergleich zu Beispiel 6 alle um etwa 1-2 kD höhere Molekulargewichte zeigten. Diese  
25 Banden wurden dann gemäss Beispiel 6 auf PVDF-Membranen übertragen und mit 0,15% 35 Serva-Blau in  
Methanol/Wasser/Eisessig (50/40/10 Volumenteile) während 1 Minute gefärbt, mit Methanol/Wasser/Eisessig  
30 (45/48/7 Volumenteile) entfärbt, mit Wasser gespült, luftgetrocknet und danach ausgeschnitten. Bei sämtli-  
chen Schritten wurde zur Vermeidung von N-terminaler Blockierung die von Hunkapiller [34] angegebenen  
Bedingungen eingehalten. Zunächst wurden die gereinigten TNF-BP unverändert zur Aminosäuresequen-  
zierung eingesetzt. Um zusätzliche Sequenzinformation zu erhalten, wurden die TNF-BP nach Reduktion  
35 und S-Carboxymethylierung [Jones, B.N. (1986) in "Methods of Protein Microcharacterisation", J.E. Shively,  
ed., Humana Press, Clifton NJ, 124-125] mit Bromcyan (Tarr, G.E. in "Methods of Protein Microcharacteri-  
sation", 165-166, op.cit.), Trypsin und/oder Proteinase K gespalten und die Peptide mittels HPLC nach  
bekannten Methoden der Proteinchemie aufgetrennt. So vorbereitete Proben wurden dann in einem  
automatisierten Gasphasen-Mikrosequenzierr-Gerät (Applied Biosystems Modell 470A, ABI, Foster City,  
40 Calif., USA) mit einem on-line nachgeschalteten automatisierten HPLC PTH-Aminosäureanalysator (Applied  
Biosystems Modell 120, ABI s.o.) sequenziert, wobei die folgenden Aminosäuresequenzen bestimmt  
wurden:

1.. Für die 55 kD-Bande (gemäss nichtreduzierender SDS-PAGE):  
Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu-Lys-Arg-Asp-Ser-Val-Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-X-

40 Asn-Ser-Ile,

und

Ser-Thr-Pro-Glu-Lys-Glu-Gly-Leu-Glu-Gly-Thr-Thr-Lys

wobei X für einen Aminosäurerest steht, der nicht bestimmt werden konnte.

2.. Für die 51 kD und die 38 kD-Banden (gemäss nichtreduzierender SDS-PAGE):

45 Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-AsP-Arg-Glu

3.. Für die 65 kD-Bande (gemäss nichtreduzierender SDS-PAGE): Bei der N-terminalen Sequenzierung  
der 65 kD Bande wurden bis zum 15. Rest ohne Unterbrechung zwei parallele Sequenzen ermittelt. Da  
eine der beiden Sequenzen einer Teilsequenz des Ubiquitins [36,37] entsprach, wurde für die 65 kD-  
Bande die folgende Sequenz abgeleitet:

50 Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-X-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys.

wobei X für einen Aminosäurerest steht, der nicht bestimmt werden konnte.

Weitere Peptidsequenzen für 75(65)kDa-TNF-BP wurden bestimmt:

Ile-X-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Tyr-Pro-Ala-Leu-Glu

und

55 Ser-Gln-Leu-Glu-Thr-Pro-Glu-Thr-Leu-Leu-Gly-Ser-Thr-Glu-Glu-Lys-Pro-Leu

und

Val-Phe-Cys-Thr

und

Für die Expression in COS-Zellen wurden Vektoren ausgehend von dem Plasmid "pN11" konstruiert. Das Plasmid "PN11" enthält den effizienten Promotor und Enhancer des "major immediate-early" Gens des menschlichen Cytomegalovirus ("HCMV"; Boshart et al., Cell 41, 521-530, 1985). Hinter dem Promotor befindet sich eine kurze DNA-Sequenz, welche mehrere Restriktionschnittstellen enthält, die nur einmal im 5 Plasmid vorkommen ("Polylinker"), u.a. die Schnittstellen für HindIII, Ball, BamHI und PvuII (siehe Sequenz).

**PvuII**

10 5' -AAGCTTGGCCAGGATCCAGCTGACTGACTGATCGCGAGATC-3'  
 3' -TTCGAACCGGTCTAGGTGACTGACTGACTAGCGCTCTAG-5'

Hinter diesen Schnittstellen befinden sich drei Translations-Stopcodons in allen drei Leserastern. Hinter der 15 Polylinkersequenz befindet sich das 2. Intron und das Polyadenylierungssignal des Präproinsulingens der Ratte (Lomedico et al., Cell 18, 545-558, 1979). Das Plasmid enthält ferner den Replikationsursprung des SV40 Virus sowie ein Fragment aus pBR322, das E. coli-Bakterien Ampicillin-Resistenz verleiht und die Replikation des Plasmids in E. coli ermöglicht.

Zur Konstruktion des Expressionsvektors "pN123" wurde dieses Plasmid "pN11" mit der Restriktionsendonuklease PvuII geschnitten und anschliessend mit alkalischer Phosphatase behandelt. Der dephosphorylierte Vektor wurde danach aus einem Agarosegel isoliert (V1). Die 5'-überhängenden Nukleotide des EcoRI-geschnittenen 1,3kb-Fragments der 55 kD TNF-BP-cDNA (siehe Beispiel 8) wurden mit Hilfe von Klenow-Enzym aufgefüllt. Anschliessend wurde dieses Fragment aus einem Agarosegel isoliert (F1). Danach wurden V1 und F1 mittels T4-Ligase miteinander verbunden. E. coli HB101-Zellen wurden dann mit 25 diesem Ligierungsansatz nach bekannten Methoden [42] transformiert. Mit Hilfe von Restriktionsanalysen und DNA-Sequenzierung nach bekannten Methoden [42] wurden Transformanten identifiziert, die mit einem Plasmid transformiert worden waren, welches das 1,3kb EcoRI-Fragment der 55 kD TNF-BP-cDNA in der für die Expression über den HCMV-Promotor korrekten Orientierung enthielt. Dieser Vektor erhielt die Bezeichnung "pN123".

30 Zur Konstruktion des Vektors "pK19" wurde folgendermassen verfahren. Ein DNA-Fragment, welches nur die für den extrazellulären Teil des 55 kD TNF-BP codierende cDNA enthält (Aminosäuren -28 bis 182 gemäss Figur 1) wurde mittels PCR-Technologie erhalten (Saiki et al., Science 230, 1350-1354, 1985, siehe auch Beispiel 8). Die folgenden Oligonukleotide wurden, um die für den extrazellulären Teil des 55 kD TNF-BP codierende cDNA aus "pN123" zu amplifizieren, verwendet:

35 **BAMHI**

5' -CACAGGGATCCATAGCTGTCTGGCATGGGCCTCTCCAC-3'

40 **ASP718**

3' -CGTGACTCCTGAGTCCTGGTATTATCTCTAGACCATGGCCC-5'

Durch diese Oligonukleotide wurden ebenfalls zwei Stopcodons der Translation hinter Aminosäure 182 eingeführt. Das so amplifizierte DNA-Fragment wurde mit BamHI und Asp718 geschnitten die hierbei entstandenen Überstehenden Enden mit Hilfe des Klenow-Enzyms aufgefüllt und dieses Fragment anschliessend aus einem Agarosegel isoliert (F2). F2 wurde dann mit V1 ligiert und der gesamte Ansatz zur Transformation von E. coli HB101, wie bereits beschrieben verwendet. Transformanten, die mit einem Plasmid transformiert worden waren, welches das DNA-Fragment in der für die Expression über den 50 HCMV-Promotor korrekten Orientierung enthielten, wurden mittels DNA-Sequenzierung (s.o.) identifiziert. Das daraus isolierte Plasmid erhielt die Bezeichnung "pK19".

Transfektion der COS-Zellen mit den Plasmiden "pN123" oder "pK19" wurde nach der von Felgner et al. veröffentlichten Lipofections-Methode (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417, 1987) durchgeführt. 72 Stunden nach erfolgter Transfektion wurden die mit "pN123" transfizierten Zellen nach bekannten Methoden mit <sup>125</sup>I-TNF $\alpha$  auf Bindung analysiert. Das Resultat der Scatchard-Analyse [Scatchard, G., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660, 1949] der so erhaltenen Bindungsdaten (Figur 2A) ist in Figur 2B dargestellt. Die Kulturüberstände der mit "pK19" transfizierten Zellen wurden in einem "Sandwich"-Test untersucht. Dazu wurden PVC-Microtiterplatten (Dynatech, Arlington, VA, USA) mit 100  $\mu$ l Loch eines Kaninchen-anti-Maus

partielle 55 kD TNF-BP cDNA korrekt für die Expression integriert worden war, erfolgte wie bereits beschrieben. Das aus diesen Transformanten isolierte Plasmid erhielt den Namen "pN119".

Zur Konstruktion des Transfervektors "pN124" wurde folgendermassen vorgegangen. Das in Beispiel 9 beschriebene, für den extrazellulären Teil des 55 kD TNF-BP codierende cDNA-Fragment wurde mit den angegebenen Oligonukleotiden mit Hilfe der PCR-Technologie, wie in Beispiel 9 beschrieben amplifiziert. Dieses Fragment wurde mit BamHI und Asp718 geschnitten und aus einem Agarosegel isoliert (F4). Das Plasmid "pNR704" wurde ebenfalls mit BamHI und Asp718 geschnitten und der Vektorrumpf (V4) wurde isoliert (s.o.). Die Fragmente V4 und F4 wurden ligiert. E. coli HB101 damit transformiert und der rekombinante Transfervektor "pN124" wurde, wie beschrieben, identifiziert und isoliert.

Zur Transfektion der Insektenzellen wurde folgendermassen vorgegangen. 3 µg des Transfervektors "pN113" wurden mit 1 µg DNA des *Autographa californica*-Nuklear-polyhedrosisvirus (AcMNPV) (EP 127839) in SF9-Zellen (ATCC CRL 1711) transfektiert. Polyhedrin negative Viren wurden identifiziert und aus "Plaques" gereinigt [52]. Mit diesen rekombinannten Viren wurden wiederum SF9 Zellen wie in [52] beschrieben infiziert. Nach 3 Tagen in Kultur wurden die infizierten Zellen auf Bindung von TNF mittels <sup>125</sup>I-TNF $\alpha$  untersucht. Dazu wurden die transfektierten Zellen mit einer Pasteurpipette von der Zellkulturschale abgewaschen und bei einer Zelldichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml Kulturmedium [52], das 10 ng/ml <sup>125</sup>I-TNF $\alpha$  enthielt, sowohl in Anwesenheit wie Abwesenheit von 5 µg/ml nichtmarkiertem TNF $\alpha$  resuspendiert und 2 Stunden auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit reinem Kulturmedium gewaschen und die zellgebundene Radioaktivität in einem  $\gamma$ -Zähler gezählt (siehe Tabelle 2).

20

Tabelle 2

25

Zellen	Zellgebundene Radioaktivität pro $10^6$ Zellen
nichtinfizierte Zellen (Kontrolle)	60 cpm
infizierte Zellen	$1600 \pm 330$ cpm <sup>11</sup> )

30

<sup>11</sup> Mittelwert und Standardabweichung aus 4 Experimenten

35

Beispiel 11

Analog zu dem in Beispiel 9 beschriebenen Verfahren wurde das für den extrazellulären Bereich des 55 kDa TNF-BP codierende cDNA-Fragment, nun jedoch mit den folgenden Oligonukleotiden als Primer, in einer Polymerasen-Kettenreaktion amplifiziert:

## Oligonukleotid 1:

45

Sst I

5'-TAC GAG CTC GGC CAT AGC TGT CTG GCA TG-3'

50

## Oligonukleotid 2:

Sst I

55

5'-ATA GAG CTC TGT GGT GCC TGA GTC CTC AG-3'

Dieses cDNA-Fragment wurde in den pCD4-H $\gamma$ 3-Vektor [DSM 5523; Europäische Patentanmeldung Nr.

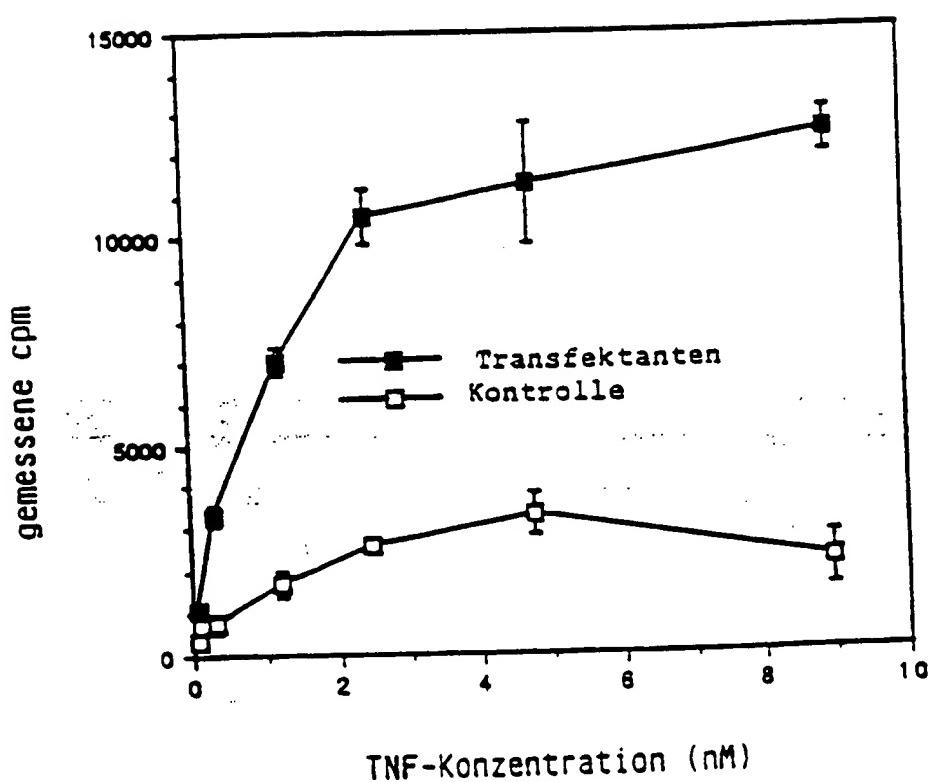
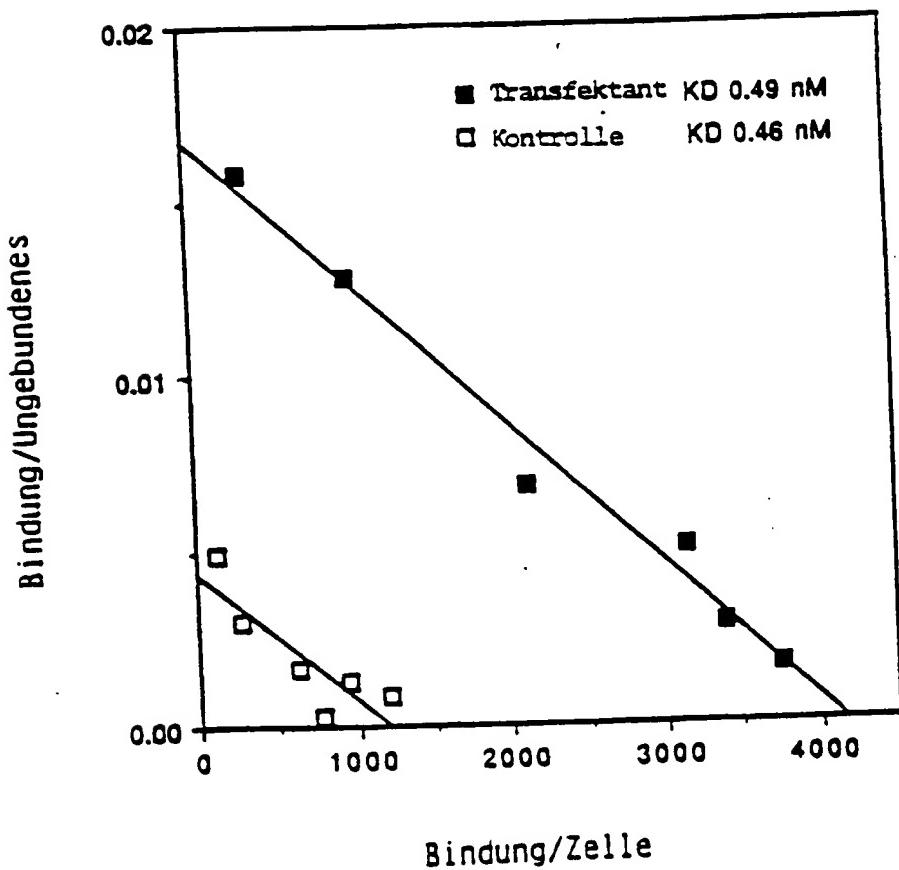
- Related Cytokines, Napa, California, 15.-20. Januar 1989  
 32. M. Brockhaus, H. Lötscher, H.-P. Hohmann und W. Hunziker: Abstract, 2nd Intern. Conference on Tumor Necrosis Factor and Related Cytokines, Napa, California, 15.-20. Januar 1989  
 33. C.R. Cantor and P.R. Schimmel, in Biophysical Chemistry, W.H. Freeman, ed., San Francisco, 1980, p. 850  
 34. M.W. Hunkapiller, E. Lujan, F. Ostrander, L.E. Hood: Methods Enzymol. 91, 227, 1983  
 35. U.K. Lammlie: Nature 227, 680, 1970  
 36. T.St. John, W.M. Gallatin, M. Siegelman, H.T. Smith, V.A. Fried and I.L. Weissman: Science 231, 845, 1986  
 37. M. Siegelman, M.W. Bond, W.M. Gallatin, T.St. John, H.T. Smith, V.A. Fried and I.L. Weissman: Science 231, 823, 1986  
 38. H. Towbin, T. Staehelin and J. Gordon: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350, 1979  
 39. Dinarello, Ch.A., in Lymphokines, Vol. 14, E. Pick, ed., p. 1, Academic Press, London, 1987  
 40. D.J. Merchant, R.H. Kahn and W.H. Murphy: Handbook of Cell and Organ Culture, Burgess Publ. Co., Minneapolis, 1969  
 41. G.E. Grau, T.E. Taylor, M.E. Molyneux, J.J. Wirima, P. Vassalli, M. Hommel and P. Lambert: New Engl. J. Med. 320, 1586, 1989  
 42. J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989  
 43. F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman and K. Struhl: Current Protocols in Molecular Biology 1987-1988, S. Wiley and Sons, New York, 1987  
 44. E. Harlow and D. Lane: Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Publications, New York, 1988  
 45. S. Fazekas de St. Groth and D. Scheidegger: J. Immunol. Methods 35, 1, 1980  
 46. D. Pennica and D.V. Goeddel, in Lymphokines, Vol. 13, D.R. Webb and D.V. Goeddel, eds. p. 163, Academic Press, London, 1987  
 47. J. Tavernier, L. Franzen, A. Marmenout, J. van der Heyden, R. Muller, M. Ruysschaert, A. van Vliet, R. Banden and W. Fiers, in Lymphokines, Vol. 13, D.R. Webb and D.V. Goeddel, eds., p. 181, Academic Press, London  
 48. P.J. Fraker and J.C. Speck: Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 849, 1987  
 49. D.H. Erlich, D.H. Gelfand, R.K. Saiki: Nature 331, 61, 1988  
 50. Bosserhoff, J. Wallach and R.W. Frank: J. Chromatogr. 473, 71, 1989  
 51. R. Lathe: J. Mol. Biol. 183, 1, 1985  
 52. Luckow and Summers, "A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures", Texas Agricultural Experimental Station, Texas A & M University, Bulletin Nr. 1555, 2nd edition, 1988

### Ansprüche

- 40 1. Nichtlösliche Proteine und lösliche oder nichtlösliche Fragmente davon, die TNF binden, in homogener Form, sowie deren physiologisch verträgliche Salze.  
 2. Verbindungen gemäss Anspruch 1, die durch Molekulargewichte gemäss SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen von etwa 55 kD und 75 kD charakterisiert sind.  
 45 3. Verbindungen gemäss einem der Ansprüche 1 und 2, die wenigstens eine der folgenden Aminosäuresequenzen enthalten:  
 Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu-Lys-Arg-Asp-Ser-Val-Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-X-Asn-Ser-Ile;  
 Ser-Thr-pro-Glu-Lys-Glu-Gly-Glu-Leu-Glu-Gly-Thr-Thr-Thr-Lys;  
 50 Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-X-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys;  
 Ile-X-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Tyr-Pro-Ala-Leu-Glu;  
 Ser-Gln-Leu-Glu-Thr-Pro-Glu-Thr-Leu-Gly-Ser-Thr-Glu-Gly-Lys-Pro-Leu;  
 Val-Phe-Cys-Thr;  
 Asn-Gin-Pro-Gln-Ala-Pro-Gly-Val-Glu-Ala-Ser-Gly-Ala-Gly-Glu-Ala;  
 55 Leu-Cys-Ala-Pro;  
 Val-Pro-His-Leu-Pro-Ala-Asp;  
 Gly-Ser-Gln-Gly-Pro-Glu-Gln-Gln-X-X-Leu-Ile-X-Ala-Pro  
 wobei X für einen nicht bestimmten Aminosäurerest steht.

Figur 1

-185 GAATTGGGGGGTCAAGATCACTGGGACCCAGGCCGTGATCTCTATGCCCGAGTCCTCAA  
 -125 CCCTCACTGTCACCCCAAGGCACTTGGGACGTCTGGACAGACCCAGTCCTGGAAAGCC  
 -65 CCAGCAGTGGCGCTGCCACACTGCCCTGAGCCAAATGGGGAGTGAGAGGCCATAGCTG  
 -28.  
 -30 MetGlyLeuSerThrValProAspLeuLeuLeuProLeuValLeuLeuGluLeu  
 -5 TCTGGCATGGGCCTCTCCACCCTGCCTGACCTGCTGCCGCTGGTGCTCCTGGAGCTG  
 +1  
 -10 LeuValGlyIleTyrProSerGlyValIleGlyLeuValProHisLeuGlyAspArgGlu  
 55 TTGGTGGGAATATAACCCCTCAGGGTTATTGGACTGGTCCCTCACCTAGGGACAGGGAG  
 \*\*\*  
 10 LysArgAspSerValCysProGlnGlyLysTyrIleHisProGlnAsnAsnSerIleCys  
 115 AAGAGAGATAGTGTGTCCCCAAGGAAAATATATCCACCCCTCAAAATAATTGATTG  
 30 CysThrLysCysHisLysGlyThrTyrLeuTyxAsnAspCysProGlyProGlyGlnAsp  
 175 TGTACCAAGTGCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCAGGCCGGGCAGGAT  
 50 ThrAspCysArgGluCysGluSerGlySerPheThrAlaSerGluAsnHisLeuArgHis  
 235 ACGGACTGCAGGGAGTGTGAGAGCCCTTCACCGCTTCAGAAAACCACCTCAGACAC  
 70 CysLeuSerCysSerLysCysArgLysGluMetGlyGlnValGluIleSerSerCysThr  
 295 TGCCCTCAGCTGCTCCAATGCCGAAAGGAAATGGTCAGGTGGAGATCTCTTCTGCACA  
 90 ValAspArgAspThrValCysGlyCysArgLysAsnGlnTyrArgHisTyrTrpSerGlu  
 355 GTGGACCGGGACACCGTGTGGCTGCAGGAAGAACGATCCGGCATTATTGGAGTGAA  
 \*\*\*  
 110 AsnLeuPheGlnCysPheAsnCysSerLeuCysLeuAsnGlyThrValHisLeuSerCys  
 415 AACCTTTCCAGTGCTCAATTGCAGCCTCTGCCTCAATGGGACCGTGCACCTCTCCTGC  
 130 GlnGluLysGlnAsnThrValCysThrCysHisAlaGlyPhePheLeuArgGluAsnGlu  
 475 CAGGAGAAACAGAACACCGTGTGCACCTGCCATGCAGGTTCTTAAGAGAAAACGAG  
 150 CysValSerCysSerAsnLysLysSerLeuGluCysThrLysLeuCysLeuProGln  
 535 TGTGTCTCTGTAGTACTGTAAGAAAAGCCTGGAGTGCACGAAGTTGTGCCTACCCAG  
 170 IleGluAsnValLysGlyThrGluAspSerGlyThrThrValLeuLeuProLeuValIle  
 595 ATTGAGAAATGTTAGGGCACTGAGGACTCAGGCACCACTGCTGTTGCCCTGGTCATT  
 190 PhePheGlyLeuCysLeuLeuSerLeuLeuPheIleGlyLeuMetTyrArgTyrGlnArg  
 655 TTCTTTGGCTTTGCCTTTATCCCTCTCTCATGGTTAATGTATCGCTACCAACGG  
 210 TrpLysSerLysLeuTyrSerIleValCysGlyLysSerThrProGluLysGluGlyGlu  
 715 TGGAAAGTCCAAGCTACTCCATTGTTGTGGAAATCGACACCTGAAAGCTTCAGTCCCACCTCCAGGC  
 \*\*\*  
 230 LeuGluGlyThrThrLysProLeuAlaProAsnProSerPheSerProThrProGly  
 775 CTTGAAGGAACTACTAAAGCCCCCTGGCCCCAACCCAGCTTCAGTCCCACCTCCAGCTCCAGGC  
 250 PheThrProThrLeuGlyPheSerProValProSerSerThrPheThrSerSerThr  
 835 TTCACCCCCCACCCTGGCTCAGTCCCAGTTCCACCTCACCTCCAGCTCCACC  
 270 TyrThrProGlyAspCysProAsnPheAlaAlaProArgArgGluValAlaProProTyr  
 895 TATAACCCCCCGGTGACTGTCCCAACTTTGGCTCCCCCAGAGAGGGCACCACCCCTAT  
 290 GlnGlyAlaAspProIleLeuAlaThrAlaLeuAlaSerAspProIleProAsnProLeu  
 955 CAGGGGGCTGACCCCATCCTTGCACAGCCCTCGCCTCCGACCCCCATCCCCAACCCCTT

Figur 2AFigur 2B

Figur 4

Tn2

← Asp →

11 SerAspSerValCysAspSerCysGluAspSerThrTyrThrGlnLeuTrpAsnTrpVal  
 1 TCGGACTCCGTGTGACTCCTGTGAGGACAGCACATAACCCCAGCTCTGGAACTGGGTT

21 ProGluCysLeuSerCysGlySerArgCysSerSerAspGlnValGluThrGlnAlaCys  
 61 CCCGAGTGCTTGAGCTGTGGCTCCCGCTGTAGCTCTGACCCAGGTGGAAACTCAGCCTGC

41 ThrArgGluGlnAsnArgIleCysThrCysArgProGlyTrpTyrCysAlaLeuSerLys  
 121 ACTCGGGAACRGAACCGCATCTGCACCTGCAGGCCGGCTGGTACTGCACGCTGAGCAG

61 GlnGluGlyCysArgLeuCysAlaProLeuProLysCysArgProGlyPheGlyValAla  
 181 CAGGAGGGGTGCCGGCTGTGCGCGCCGCTGCCGAAAGTGCCGCCGGGCTTCGGCGTGGCC

81 ArgProGlyThrGluThrSerAspValValCysLysProCysAlaProGlyThrPheSer  
 241 AGACCCAGGAACTGAAACATCAGACGTGGTGTGCAAGCCCTGTGCCCGGGACGTTCTCC

101 AsnThrThrSerSerThrAspIleCysArgProHisGlnIleCysAsnValValAlaIle  
 301 AACACGACTTCATCCACGGATATTCGAGGCCACCGATCTGTRACGTGGTGGCCATC

121 ProGlyAsnAlaSerArgAspAlaValCysThrSerThrSerProThrArgSerMetAla  
 361 CCTGGGAAATGCAGCAGGGATGCAAGTCTGCACGTCCACGTCCCCACCCGGAGTATGGCC

141 ProGlyAlaValHisLeuProGinProValSerThrArgSerGlnHisThrGlnProSer  
 421 CCAGGGGCAGTACACTTACCCCGCCAGTGTCCACCGATCCACACACCGCAGGCCAGT

161 ProGluProSerThrAlaProSerThrSerPheLeuLeuProMetGlyProSerProPro  
 481 CCAGAACCCAGCACTGCTCCAGCACCTCCCTGCTCCACATGGGCCAGGCCAGGCC

181 AlaGluGlySerThrGlyAspPheAlaLeuProValGlyLeuIleValGlyValThrAla  
 541 GCTGAAAGGGAGCACTGGCGACTTCGCTCTCCAGTTGGACTGATTGTGGGTGTGACAGCC

201 LeuGlyLeuLeuIleIleGlyValValAsnCysValIleMetThrGlnValLysLysLys  
 601 TTGGGTCTRACTAATAATAGGAGTGGTGAACGTGTGTCATGACCCAGGTGAAAAAGGAG

221 ProLeuCysLeuGlnArgGluAlaLysValProHisLeuProAlaAspLysAlaArgGly  
 661 CCCTTGTGCCTGCAGAGAGAGCCAGGTGCCTCAGTTGCCTGCCGATAAGGCCGGGGT

241 ThrGlnGlyProGluGlnGlnHisLeuLeuIleThrAlaProSerSerSerSerSer  
 721 ACACAGGGCCCCGAGCAGCACCTGCTGATCACAGCGCCGAGCTCCAGCAGCAGCTCC

261 LeuGluSerSerAlaSerAlaLeuAspArgArgAlaProThrArgAsnGlnProGinAla  
 781 CTGGAGAGCTCGGCCAGTGCAGTTGGACAGAAGGGCGCCACTCGGAACCCAGGCCACAGGCA